

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-205885

(43) 公開日 平成8年(1996)8月13日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/00	A			
// A 6 1 K 39/395				
C 1 2 N 15/02				
C 1 2 P 21/08				
	9162-4B	C 1 2 N 15/ 00	C	
	審査請求 有	請求項の数13	OL (全 13 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-278186	(71) 出願人	591180152
(62) 分割の表示	特願平1-506487の分割		ラ ホヤ キャンサー リサーチ ファウ ンデーション
(22) 出願日	平成1年(1989)5月22日		LA JOLLA CANCER RES EARCH FOUNDATION
(31) 優先権主張番号	1 9 6 , 9 8 6		アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037,
(32) 優先日	1988年5月20日		ラ ホヤ, ノース トレイ パインズ ロ ード 10901
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(72) 発明者	エルキ アイ. ルオスラーティ
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067
			ランチョ サンタ フェ, ピー. オー. ボックス 1054
		(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラミニンの付着受容体およびその使用

(57) 【要約】

【課題】 ラミニン付着受容体を単離および精製する方法ならびにラミニン付着受容体の医療上の利用手段を提供する。

【解決手段】 ラミニンまたはラミニンの細胞付着促進断片と選択的に結合する受容体であって、 α および β からなる2つのサブユニットを含み、該 α サブユニットはさらに2つのジスルフィド結合されたポリペプチドを含むインテグリン α_3 である受容体を含有する組成物ならびに該受容体を哺乳類細胞抽出調製物から単離する方法。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 インテグリンラミニン付着受容体を哺乳類細胞抽出調製物から単離する方法であって、以下の行程：

- a. ラミニンの細胞付着促進部位をマトリックスに結合させてアフィニティークラムを構成する工程；
- b. 単離されるべき細胞表面受容体とラミニン細胞付着部位との間の結合を形成するために、二価カチオンの存在下でカラムに該哺乳類細胞抽出調製物を流す工程；
- c. 該結合に干渉し細胞表面受容体を選択的に溶離し得る物質を含む溶液で該カラムを溶離する工程；および
- d. 溶離された該細胞表面受容体を採取する工程；を包含する方法：ここで該受容体は、ラミニンまたはラミニンの細胞付着促進断片と選択的に結合する受容体であって、 α および β からなる2つのサブユニットを含み、該 α サブユニットはさらに2つのジスルフィド結合されたポリペプチドを含むインテグリン α_3 である受容体である。

【請求項2】 前記マトリックスがアガロース由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記物質が、RuG1iグリア芽細胞腫細胞およびMG-63骨肉腫細胞の付着によって規定されるラミニンの細胞付着部位を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記細胞抽出調製物が培養哺乳類細胞由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】 前記細胞抽出調製物が哺乳類組織由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 前記細胞抽出調製物がヒト細胞由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記ヒト細胞が骨肉腫細胞である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 前記細胞抽出調製物が胎盤組織由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項9】 前記細胞抽出調製物がラット細胞由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項10】 ラミニンを含む特異的組織成分に薬剤を標的化する方法であって、以下の行程：

- a. インテグリンラミニン付着受容体および／またはラミニン結合活性を保持する該受容体の修飾物を、薬剤を有するリボソームに取り入れる工程；および
- b. 該取り入れたリボソームを該特異的組織成分に供与し、該取り入れたリボソームの結合を達成させる工程；を包含する方法：ここで該受容体は、ラミニンまたはラミニンの細胞付着促進断片と選択的に結合する受容体であって、 α および β からなる2つのサブユニットを含み、該 α サブユニットはさらに2つのジスルフィド結合されたポリペプチドを含むインテグリン α_3 である受容体である。

【請求項11】 インテグリンラミニン付着受容体と結合し、該受容体のラミニンへの結合を阻害する化合物を

2

提供することによって、ラミニン付着受容体のラミニンへの結合を阻害する方法：ここで該受容体は、ラミニンまたはラミニンの細胞付着促進断片と選択的に結合する受容体であって、 α および β からなる2つのサブユニットを含み、該 α サブユニットはさらに2つのジスルフィド結合されたポリペプチドを含むインテグリン α_3 である受容体である。

【請求項12】 インテグリンラミニン付着受容体を表現する細胞の基質表面への付着を阻害する方法であって、該受容体に結合する化合物を可溶性態で提供する工程を包含する方法：ここで該受容体は、ラミニンまたはラミニンの細胞付着促進断片と選択的に結合する受容体であって、 α および β からなる2つのサブユニットを含み、該 α サブユニットはさらに2つのジスルフィド結合されたポリペプチドを含むインテグリン α_3 である受容体である。

【請求項13】 インテグリンラミニン付着受容体を表現する細胞を基質表面に付着させる方法であって、該受容体に結合する化合物を提供する工程、および該化合物を該基質表面にコートする工程を包含する方法：ここで該受容体は、ラミニンまたはラミニンの細胞付着促進断片と選択的に結合する受容体であって、 α および β からなる2つのサブユニットを含み、該 α サブユニットはさらに2つのジスルフィド結合されたポリペプチドを含むインテグリン α_3 である受容体である。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、一般に細胞付着システムに関し、特にラミニンの付着受容体に関する。

【0002】

【従来の技術】細胞表面において起こることの多くは、その周囲にある物質の細胞による認識に関連する。第1の例は、細胞による可溶性ホルモンの結合およびそのような結合に対する反応である。細胞表面認識のもう1つの重要な局面は、細胞とそれを取り巻く不溶性構造物との相互作用である。このような構造物は、その他の細胞または細胞外マトリックスの表面であり得る。

【0003】細胞間および細胞外マトリックスとの相互作用についてはまだ十分に理解されていないが、それらは細胞の生命において重要な役割を果たしている。例えば、細胞マトリックスおよび細胞間の相互作用によって、細胞が体内のどの部分に存在するべきか、または移動する場合には、どの部分に移動するべきかが決定されるようである。特に興味深い例は、プロセスを適切な部位へ送る神経細胞であり、それによって体内の離れた部位への連絡が形成される。腫瘍がその起源細胞に不適切な体内の部分へ侵入および散在するため、部位シグナルは、明らかに癌中において損なわれている。事実、我々の細胞マトリックスおよび細胞間の相互作用の理解が高まり、その探求が可能になるにつれて、この分野は新し

3

く重要な医学の最先端として発展していくであろう。

【0004】細胞表面におけるタンパクおよび糖は両方とも細胞マトリックスおよび細胞間の相互作用に参与し得る。細胞外マトリックスは細胞によって配置されるタンパクおよび糖の不溶性網状組織から構成され、細胞内空間の大半を占める。体内における異なる部位のマトリックスは、コラーゲン、プロテオグリカン、エラスチン、ヒアルロン酸およびフィブロネクチンおよびラミニン等の様々な糖タンパクの異なる組合せからなる。事実、同定された細胞外マトリックス糖タンパクおよびコ

ラーゲンはすべて細胞と相互作用する。

【0005】細胞と細胞外マトリックス分子との相互作用の中で最も容易に観察可能な結果は、細胞付着である。細胞外マトリックスタンパクの付着特性は、細胞を細胞外マトリックス物質または精製されたマトリックスタンパクの1つによってコートされた表面にプレートすることによってインビトロで容易に示され得る。細胞は、そのような表面に容易に付着し、その上に広がる。しかし、付着タンパクは、付着を促進するだけでなく、細胞移動をも刺激する。細胞は、表面に勾配として付与された、制限された濃度の付着タンパクに直面すると、より濃度の高いところへ移動する。

【0006】細胞外マトリックスが細胞に影響する更に複雑な方法は、細胞の分化、生存および増殖を促進することである。細胞外マトリックスタンパクの1つであるラミニンは、特に細胞に大きな影響を与える。特定の細胞外マトリックスシート、基部膜に存在するこのタンパクは、細胞の付着および移動を促進し、分化および腫瘍の転移において役割を果たす。ラミニンはまた、神経細胞プロセスまたは神経突起の成長を促進および誘導する。

【0007】細胞およびラミニンの間のこれらの相互作用は、ラミニンの付着受容体として機能する細胞表面受容体によって媒介されると思われる。ラミニンの細胞に対する影響を媒介するこの単数または複数の受容体の全特性はまだ知られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、ラミニン付着受容体を同定および単離する必要がある。単離された受容体を得ることによって、この例えば腫瘍細胞の表面におけるラミニン受容体の発現を分析するために使用され得る、受容体に特異的な抗体の生成が可能となる。受容体に結合する組換え体タンパク断片のような化合物は、ラミニンの活性を再生またはラミニンを含有する構造物に対する細胞付着を阻害するのに使用され得る。更に、リポソームを、治療またはその他の目的のための特異的な組織に標的化し得る必要がある。本発明は、これらの必要性を満足すると共に、付加的な利点をも提供する。

【0009】

4

【課題を解決するための手段】本発明は、2つのサブユニット、 α および β を含み、ラミニン、およびそのポリペプチドのC00H末端部分からなるラミニンの部分由来の、ラミニンの細胞付着促進断片と相互作用することを特徴とする、実質的に純粋な哺乳類のラミニン付着受容体を提供する。ラミニンまたはラミニンの細胞付着促進断片との相互作用は、二価カチオン依存性である。大きい方の α サブユニットが、抗 α 抗血清反応性を有する。

【0010】1つの局面において、本発明は、ラミニン付着受容体を単離および精製する方法を提供する。本発明のもう1つの局面において、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体が、単離された受容体に対して調製され、その反応性が精製された受容体に対して分析される。その他のいかなる受容体も、 α サブユニットを含んでいることが知られていないので、大きい方の α サブユニットに対する抗体は、ラミニン受容体に対して特異的であるのに対して、小さい方の β サブユニットに対する抗体の中にはフィブロネクチン受容体およびその他の関連細胞付着受容体と反応し得るものがある。抗 α サブユニット抗体は、所定の細胞タイプによって発現されるラミニン受容体の量を決定するのに有用である。更に、細胞付着分析による選択によって、細胞のラミニンへの付着を阻害し得る抗 α サブユニット抗体が提供される。このような抗体は、インビトロ分析において、腫瘍細胞が羊水膜組織を介して侵入するのを防止する。

【0011】本発明のもう1つの局面において、受容体は、ラミニン受容体の機能を再生または阻害し得る化合物を提供するのに使用される。本発明の更にもう1つの局面において、細胞表面受容体は、リポソームの膜に取り入れられる。次いで、そのようなリポソームは、リポソームの内容物をラミニンを含む組織に標的化するのに使用され得る。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明は、ラミニンの哺乳類付着受容体に関する。ラミニンは、通常の細胞の分化および悪性細胞の転移の両方において役割を果たすことが知られている。この受容体およびそれと反応する抗体の単離は、腫瘍細胞の表面上におけるラミニン受容体の存在を検出するのに使用され得る。ラミニンに結合する細胞の能力は、その侵入および転移能力と関連しているのが発見されている。

【0013】哺乳類ラミニン付着受容体を単離および精製するために、表面を標識された哺乳類細胞の抽出物を、細胞付着を促進することが可能な固定されたラミニン断片により分画した。その他の哺乳類細胞タイプも使用され得るが、そのような細胞が神経由来の悪性細胞であることが好ましい。例えば、ラットグリア芽細胞腫細胞(RuGli)の表面を、まず、ラクトベルオキシダーゼでヨウ素化し、オクチルグルコシド中に溶解させた。Ru

Gli細胞はラミニンでコートされたプラスチック表面に付着し、その上に広がる。付着分析における細胞懸濁物に Mn^{2+} を加えることによって、ラミニンでコートされた表面への細胞の付着が高められる。同様の精製方法を適用することによって、受容体が、ヒト骨肉腫細胞MG-63または胎盤組織のような他の細胞のタイプおよび組織から単離され得る。

【0014】通常、Engvallら、J. Cell Biol. 103:2457 (1986) (本願で参考として記載されている)の方法によって、細胞付着促進活性を保持するラミニン断片を単離した。この方法には、非損傷ラミニンまたはペプシンおよびキモトリプシン以外のプロテアーゼにより生成した断片を使用する等の様々な改変が可能である。ラミニン断片を臭化シアン (CNBr) 活性セファロース (Sigma, St. Louis, MO) に結合することによって、親和性マトリックスを調製した。特定の溶離液を、EDTA (エチレンジアミノテトラ酢酸) でカラムを処理することによって得た。溶離緩衝液を除くすべての緩衝液は、受容体の親和性マトリックスへの結合を容易にするために、1mMの Mn^{2+} を含んでいた。溶離した断片を、SDS-PAGEにより、次いでオートラジオグラフィーによって分析した。図1および図2に示されるように、非還元条件下において、RuGli細胞由来のタンパクが存在する、不完全な非折りたたみ状態で、150kDおよび120kDの見かけ分子量に対応する部位に移動した2つのタンパクバンドが見られた。還元条件の下でSDS-PAGEによって決定されるより正確な分子量は、これらのサブユニットの分子量がそれぞれ約165および140kDであることを示している。なぜなら還元した場合、サブユニットの大きい方が135kDおよび35kDの分子量を有する2つのポリペプチドを生じるからである。この分析において、小さい方の成分は、35/30kDの複体として現れる。この説明によって限定されるものではないが、30kDポリペプチドは、35kDポリペプチドの開裂断片であると思われる。

【0015】RuGli細胞タンパクのサブユニットに類似するサブユニットを有するラミニン結合タンパクをまた、ヒトMG-63骨肉腫細胞および胎盤組織から単離した。このヒトラミニン受容体はまた、2つのポリペプチドからなる。しかし、大きい方のサブユニットは従来の170,000Dの分子量を有する。

【0016】本願で使用される「ラミニン付着受容体」(「ラミニンの付着受容体」とも呼ばれる)という用語は、細胞のラミニンへの付着を媒介するために機能する細胞表面受容体のことを指す。ラミニン付着受容体は、細胞付着促進活性を保持するラミニンまたはラミニン断片に特異的に結合し、ビトロネクチン、フィブリノーゲン、コラーゲンタイプIまたはアルブミンには、実質的に結合しない。天然のラミニン付着受容体は、分子量が約165から170kDおよび約140kDである2つのサブユニットから構成される。一方、大きい方のポリペプチドは、

分子量が約135kDおよび35kDである2つのジスルフィド連鎖から構成される。

【0017】「ラミニン付着受容体」という用語は、ラミニンまたはラミニン断片結合活性を保持する天然の構造物およびこの構造物の修飾物または類似体 (isoform) を指す。細胞付着促進活性を保持するラミニンまたはラミニン断片は、ラミニン付着受容体のリガンドと言われる。リガンド結合活性を破壊することなくラミニン付着受容体の構造物に、限定された改変を加えることは可能であり、一次構造物全体の一部分のみが活性を有するために必要とされ得ることが理解される。リガンド結合活性を保持する受容体の断片はこの定義内に含まれる。

【0018】本発明のラミニン付着受容体の状態を説明するのに使用される「実質的に純粋な」という用語は、その自然環境において、通常、受容体と関連または受容体と共に生じる他のタンパクを実質的に持たず、そして、例えば単離工程により取り入れられた抗体のように、干渉および希釈するような細胞表面タンパクまたはその他のタンパクから実質的に分離しているような受容体を指す。しかし、2つ以上の受容体の類似体が「実質的に純粋な」調製物において存在し得る。

【0019】単離されたラミニン付着受容体のヘテロダイマー構造物、その大きい方のサブユニットのジスルフィド結合2本鎖組成物、および還元により小さい方のサブユニットの分子量が増加することは、すべて、インテグリン (RuoslahtiおよびPierschbacher, Science 238:491(1987)を参照、本願で参考として記載されている) と呼ばれる受容体類の特性である。多数の受容体を含むインテグリンは、アミノ酸配列の類似性を共有する。

【0020】ラミニン付着受容体と既知のインテグリンとの関係を探求するために、この受容体を、アフィニティー精製されたポリクローナル抗体と共にフィブロネクチンおよびビトロネクチン受容体に免疫プロットした。抗フィブロネクチン受容体抗体は、ラミニン付着受容体の小さい方の(β)サブユニットと交差反応したが、一方、抗ビトロネクチン受容体抗体とは反応しなかった。これらの結果は、ラミニン付着受容体が特殊なタンパクで、その1つのサブユニットがフィブロネクチン受容体 β サブユニットに関連し得ることを示す。ラミニン受容体の α サブユニットは、インテグリンに属する α_3 サブユニットの細胞質領域内の、判別された配列をモデルにしたペプチドに対する抗体と反応し (Hynesら、J. Cell Biol., 印刷中)、このことはラミニン受容体の α サブユニットが α_3 であることを示唆している。図3に示すように、 β サブユニットは、フィブロネクチン受容体 β サブユニットに密接に関連する。しかし、図4は、少なくともRuGli細胞受容体の場合において、免疫学的にベータサブユニットがフィブロネクチン受容体 β サブユニットと異なり得ることを示す。

【0021】ラミニン受容体のリガンド結合の特異性をリポソーム結合分析において研究した。受容体を、Pytellaら、Cell 40:191, (1985) (本願で参考として記載されている)の方法によってホスファチジルコリンリポソーム膜に取り入れた。簡単に述べれば、受容体およびホスホリドを含む洗浄剤溶液を、洗浄剤を含まない緩衝液に対して透析する。生成したリポソームは、ラミニンでコートされた基質表面に強力に付着した。これらはまた、ある程度の変動はあるが、フィブロネクチン、タイプIVおよびタイプIコラーゲンに結合した。しかし、ビトロネクチン、フィブリノーゲンまたはアルブミンでコートされた基質表面には結合しなかった。これに対して、同様の細胞からフィブロネクチン受容体と共に形成されたりポソームは、フィブロネクチンに強力に結合し、ラミニンとの相互作用を示さなかった。ラミニン付着受容体と共に調製されたりポソームの付着は、細胞がフィブロネクチンおよびビトロネクチン (Gehlsenら、J. Cell. Biol. 106:925-950(1988); 本願で参考として記載されている) と結合するのを阻害するGRGDSPペプチド、またはラミニン由来のその他のペプチド (Grafら、Cell 48:989, (1987); 本願で参考として記載されている) によってではなく、精製された細胞付着促進ラミニン断片によって阻害された。すべてのペプチドは、従来の1文字の略号によって示される。これらの結果は、ラミニン付着受容体がリポソーム膜に取り入れられ得、ラミニンとの所望される結合をリポソームまで持ち込むことを示す。

【0022】特定の組織に薬剤を送達するために、薬剤を充填した上記ラミニン付着受容体リポソームを、ラミニンを含む基質膜に標的化するのに有用である。例えば、腎臓系球体における沈澱物は、タンパク加水分解酵素およびその他の酵素で負荷されたりポソームで、受容体媒介標的化によって、処理され得る。上記の標的化は、静脈投与のような種々の方法により、実施し得る。

【0023】非脂質表面を受容体でコートするために、そのようなコーティングまたは結合に用いられる多数の周知の方法の1つを使用して、溶液からの受容体を、プラスチックのような表面に吸着または共有結合させる。リガンド結合活性を保持するが、分子の膜包埋部分を欠損する受容体断片は、完全な受容体よりも更に溶解性が高いため、有利に利用される。受容体でコートされたこのような材料は、例えば人工レンズのように基質膜の付着が所望される人工器官として使用される。

【0024】単離されたラミニン受容体の結合特異性はまた、ラミニンまたはその他のタンパクによってコートされたマイクロタイターウェル中で¹²⁵Iで標識された受容体をインキュベートし、放射能のウェルへの結合を測定することからなる放射受容体分析において調べられている。各細胞タイプからのラミニン受容体はラミニンによってコートされたウェルと結合した。これらもすべ

てフィブロネクチンに対してある種のアフィニティーを示し、受容体の中にはタイプIVコラーゲンと結合するものもあった (図6)。後者の結果から、様々な細胞タイプから単離された受容体が2つのカテゴリータイプIVコラーゲン非結合 (例えば、RuG1i) およびタイプIVコラーゲン結合 (例えば、MG63) に分類されることが示唆される。これらのタイプの受容体の間にはいかなる化学的相違も確立されていなかった。

【0025】また、放射受容体分析を使用して、様々なタンパク断片がラミニンおよびその受容体の間の相互作用を阻害する能力を査定した (図7)。分子のC00H末端部を構成する部分由来のラミニンの断片 (Dillnerら、前出) は、結合を阻害した。更に、その分子の細胞付着領域由来のフィブロネクチン断片もまた、阻害的であった。断片のラミニン受容体の相互作用を阻害する能力は、腫瘍細胞が血管基質膜へ付着するのを防止するのに有用である。この分析は、ラミニン受容体とラミニンとの相互反応を阻害できるその他の物質を同定するのに有用である。

【0026】ラミニン付着受容体に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を、当該技術分野に既知の手法に従って調製した。ポリクローナル抗体を、セファロースに結合した精製フィブロネクチン受容体により吸収させる (Argravesら、前出)。ラミニンおよびフィブロネクチン受容体のβサブユニットは類似しており、フィブロネクチン受容体βサブユニットは、多数のその他のインテグリンによって共有されるため、この処理により、このインテグリン類における受容体によって共有される決定基に対する抗体が除去される。また、この処理により、ラミニンおよびフィブロネクチン親和性マトリックスの両方に非特異的に結合する混入タンパクに対する抗体が除去される。必要に応じて、このような抗体はまた、「疑似精製(mock-purified)受容体調製」 (実施例6を参照) により抗血清を吸収することによって除去され得る。抗体の特異性は、酵素免疫分析; 表面がヨウ素化されそして代謝的に標識された細胞からの洗浄剤抽出物の免疫沈澱; ならびに当該技術分野で既知の方法により得られた単離されたラミニン受容体、その他の単離されたインテグリン、および全細胞抽出物の免疫プロットングを実施することによって調べられる。図4に示されるように、RuG1i細胞受容体の場合には、RuG1i細胞ラミニン受容体に対して形成された抗血清をRuG1i細胞フィブロネクチン受容体と共に吸収することによって、主としてラミニン受容体と反応性を有する抗体の調製物を産生した。

【0027】モノクローナル抗体を、単離された受容体または受容体を含むその他の物質で免疫し、次いで当該技術分野で周知の抗体生成ハイブリドーマ細胞を単離することによって調製する。 (例えば、HarlowおよびLane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Har

bor, 1988; 本願で参考として記載されている; を参照)。適切なハイブリドーマ細胞を、精製ラミニン受容体を用いて酵素免疫分析を行うことによって選択する。ラミニン受容体に対して特異的な抗体は、ラミニン受容体のサブユニットの中の1つと反応するが、他のインテグリンサブユニットとは反応しない抗体を選択する、免疫プロットングを使用することによって得られる。受容体のラミニン結合活性を阻害し得るラミニン受容体に対して特異的な抗体を得るために、サブユニット特異性モノクローナル抗体を、ラミニンへの細胞付着阻害剤としてテストする。この分析は、抗体の存在および不在下において細胞をマイクロタイターウェルに付着させることによって行なわれる。最後に、付着を促進する抗体の選択を、種々の異なる濃度において精製抗体でマイクロタイターウェルをコートし、次いで、ラミニン受容体を有する細胞をウェルに加えることによって行う。血清アルブミンのような不活性のタンパクでコートされたウェルに対して細胞の付着を増加させることによって、所望の特性を有する抗体の存在が示される。

【0028】ラミニン付着受容体はまた、様々な化合物のラミニンへの結合のための競合能力を調べるため、この化合物をスクリーニングするのに使用され得る。好ましくは、このようなスクリーニングは、実施例8に記載されるように阻害分析を使用して行われる。その他の方法も当該技術者により明白である。この阻害分析は、未知の物質または物質の混合物の阻害活性を調べるために、これらをスクリーニングするのに有利に使用され得る。このような混合物が阻害活性を有していることが発見されると、次いで、特定の活性化化合物を単離または同定するために分画され得る。このような活性化化合物は、基質表面をそのような化合物でコートすることによってラミニン付着受容体を表現する細胞の基質表面への付着を促進するのに、または可溶形態で化合物を提供することによってそのような細胞のラミニンへの付着を阻害するのに使用され得る。本発明は、現在における好ましい実施態様を参照して説明したが、本発明の精神を逸脱しないようになされた様々な改変が可能であることは理解されなければならない。

【0029】本発明の本質は、図面を参照することにより、十分に理解される。

【0030】図1は、ラミニン親和性マトリックスから溶離された画分のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分析を示す。RuGliグリア芽細胞腫細胞の表面を標識して抽出し、その抽出物を共有結合したラミニンの細胞付着促進断片を含むセファロースカラムにより以下の実施例1に説明されるように分画したものである。各画分の一部を、非還元条件の下でSDS-PAGEによって分析し、オートラジオグラフィーを使用してタンパクバンドを可視化した。レーン1~13は、カラムのEDTA溶離物由来の断片を示す。分子量マ

ーカーは、ミオシン、200kD; β -ガラクトシダーゼ、16kD; ホスホリラーゼB、94kD; ウシ血清アルブミン、67kD; オバルブミン、43kDである。

【0031】図2は、非還元 (NR) および還元 (R) 条件下でのRuGliラミニン受容体 (レーン1) およびフィブロネクチン受容体 (レーン2) のSDS-PAGE分析を示す。フィブロネクチン受容体を、Pytelaら、Cell 40:548, (1985) (参考として本願に記載されている) の方法を使用して親和性マトリックスとしてフィブロネクチン細胞付着断片セファロースを使用することによってラミニン受容体と同様の細胞抽出物から得たものである。電気泳動条件は、図1と同様である。図中の矢印は、 α サブユニットの軽鎖を示す。

【0032】図3は、ラミニン受容体の免疫プロット分析を示す。RuGli細胞から単離されたフィブロネクチン (A) およびラミニン (B) 受容体を非還元条件の下で電気泳動にかけ、ニトロセルロースフィルターに移し、このフィルターをウサギ抗フィブロネクチン受容体抗体と共にインキュベートし (Argravesら、J. Cell Biol. 105:1183, 1987, 本願で参考として記載されている)、次いで、結合した抗体を、セイヨウワサビペルオキシダーゼに結合したヤギ抗ウサギIgGにより検出したものである。

【0033】図4は、ラミニンおよびフィブロネクチン受容体の免疫プロット分析を示す。RuGli細胞抽出物から単離したフィブロネクチン (レーン1、3) およびラミニン (レーン2、4) 受容体を非還元条件の下で電気泳動にかけ、ニトロセルロースフィルターに移したものである。このフィルターを、セファロース結合ラミニン受容体に吸収されたフィブロネクチン受容体に対するウサギ抗血清 (レーン1、2)、またはセファロース結合フィブロネクチン受容体に吸収されたウサギ抗ラミニン受容体抗血清 (レーン3、4) と共にインキュベートし、結合抗体をセイヨウワサビペルオキシダーゼに結合したヤギ抗ウサギIgGにより検出したものである。吸収に使用される抗フィブロネクチン受容体抗体については説明されており (Pytelaら、Meth. Enzymol., 144:475-489 (1987)、本願において参考として記載されている)、抗ラミニン受容体抗血清を、実施例1に記載のRuGli細胞から精製された受容体と共に免疫することによって調製したものである。

【0034】図5は、ラミニン受容体を含むリポソームの基質表面への結合を示す。マイクロタイターウェルを様々なタンパクでコーティングし、プラスチック上の非占有結合部位を、このウェルをウシ血清アルブミンでインキュベートすることによってブロックし、次いで、受容体リポソームのウェルへの結合または結合の阻害を、実施例2で説明されるようにテストしたものである。6つの実験結果を最大結合率 (%) により示す。BSAが付着したものからバックグラウンドを差し引いた後の平均

に標準エラーを加えたもの：LM, ヒトラミン；FN, フィブロンectin；IV, タイプIVコラーゲン；LM+LM断片, LM+20 μ gのキモトリプシンのラミン断片；LM+RGD, LM+1mg/ml GRGDSPペプチド；LM+YIGSR, LM+1mg/ml YIGSRペプチド；フィブロンectin受容体リポソーム(白抜き棒)；LMR, ラミン受容体リポソーム(斜線棒)である。

【0035】図6は、放射受容体結合分析を示す。様々なヒト(MG-63, A431)およびラット(RuGli, NRK-49F)細胞から単離された精製ヨウ素化ラミン受容体を、マイクロタイターウェルにコートした様々なタンパクと共にインキュベートし、このウェルを洗浄し、結合受容体をTBS中の1%SDSで可溶化し、ガンマカウンターで定量した結果を、ラミン結合を100パーセントとして、受容体結合率で示している。縦棒は、図中、LM, ヒトラミン；FN, ヒトフィブロンectin；CIV, タイプIVコラーゲン；CI, タイプIコラーゲン；BSA, ウシ血清アルブミン；で示されるように、異なる細胞タイプからの受容体を示す。

【0036】図7は、放射受容体結合分析におけるラミン受容体結合の阻害を示す。データは、様々な阻害剤の存在下においてラミンでコートされたマイクロタイターウェルに対するラミン受容体の結合率(%)を、阻害されないラミン結合を100パーセントとし、これと比較して示す。A-431細胞(広い斜線棒)およびRuGli細胞(狭い斜線棒)由来のラミン受容体を使用し、テストした阻害剤は、ラミン断片およびフィブロンectin断片ならびに標識されていない受容体(実施例8に記載)である。RuGli受容体は、2つの阻害剤(NA)と共にテストしていない。

【0037】

【実施例】以下の実施例は、例示することを目的としており本発明を限定するものではない。これらの実施例は、通常使用され得るものであるが、当該技術分野に既知のその他の手法も代わりに使用され得る。

【0038】実施例1

ラミン受容体の単離

a. RuGli細胞

Max Planck Institute, Tubigen, West Germanyから得られるグリア芽細胞腫細胞系RuGliをラットラミン付着受容体の源として使用した。細胞を増殖させて集密化し、そして、細胞表面をラクトペルオキシダーゼ法(Le bienら, J. Immunol. 129:2287 (1982)；本願で参考として記載されている)によって¹²⁵Iでヨウ素化し、25mMのオクチル- β -D-チオグルコシド(Calbiochem, La Jolla, CA), 1mMのMnCl₂, および1mMのフェニルメチルスルフォニルフルオリド(PMSF)(抽出緩衝液)を含有する、pH7.2のトリス緩衝液で緩衝化した生理食塩水で抽出した。Mn²⁺を、フィブロンectinアフィニティークロマトグラフィーによってフィブロンectin受容体の単離

を容易にするため、緩衝液に含有させた。

【0039】細胞付着促進および神経突起促進活性を有するラミン断片を、Wewerら, J. Biol. Chem. 258:12654 (1983)(本願で参考として記載されている)の免疫アフィニティークロマトグラフィー法によってヒト胎盤から単離した。単離に使用した4E10抗ヒトラミン抗体は、Telios Pharmaceuticals, Inc., San diego, CAから入手可能である。

【0040】上記のようにして得られた90mgのヒトラミン断片を、製造者の指示に従って、10mlの臭化シアン活性化セファロースゲル(Pharmacia, Uppsala, Sweden)に結合させることによって調製した。

【0041】5mlの充填された表面ヨウ素化細胞からの可溶性抽出物を、10ml(ベッドボリューム)のラミン-セファロースカラムにかけた。細胞抽出物をカラムに2回通過させて、カラムを30mlの抽出緩衝液で洗浄した。初期の希釈を、2mg/mlの合成ペプチドGRGDSPを含有する20mlの緩衝液で、次いで20mM EDTAを含有する20mlのカチオンを含まない緩衝液で行った。各収集された2ml画分のアリコートを非還元条件の下で7.5%のSDSポリアクリルアミドゲル上で電気泳動にかけた。オートラジオグラフィーに一夜かけることによって、タンパクバンドが観察された。GRGDSP溶離物は、親和性マトリックスから特異的に溶離されたバンドを放出しなかったのに対して、EDTA溶離物は、図1に示されるように、ラミン付着受容体を放出した。

【0042】図1および図2に示されるように、RuGli細胞由来のタンパクが非還元条件の下で存在する、不完全な非折り畳み構造を有する状態で、150kDおよび120kDの見かけ分子量に対応する部位に移動した2つのタンパクバンドが見られた。還元条件の下でSDS-PAGEによって決定されるより正確な分子量は、これらのサブユニットの分子量がそれぞれ約165および140kDであることを示している。なぜなら、還元した場合に、サブユニットの大きい方が135kD帯および35/30kDの複体である2つのポリペプチドを生じるからである。この説明によって限定することを意図したくないが、30kDのポリペプチドは、35kDのポリペプチドの開裂断片であると思われる。

【0043】b. MG-63, A-431, およびU-251細胞

ヒト骨肉腫細胞(MG-63; ATCC受託番号第CRL1427号)、ヒト表皮悪性腫瘍細胞(A-431; ATCC受託番号第CRL-1555号)およびヒトグリア芽細胞腫細胞(U-251)を、ヒトインテグリンタイプのラミン受容体の源として使用した。受容体をRuGli受容体用として、上記の方法によって単離した。得られた受容体は、大きい方の(α)サブユニットが、約170,000Dの見かけ分子量を有するRuGli受容体 α サブユニットよりも更にゆっくりと移動したことを除いて、図1に示すRuGli受容体と同様の電気泳動的な外観を有していた。

【0044】実施例2

ラミニン受容体のリポソームへの導入およびリポソームの基質表面への結合

細胞表面受容体を含むホスファチジルコリンリポソームを、フィブロネクチン受容体 (Pytelaら, Meth. Enzymol. 144:475-489, 1987) について説明したように、実質的にMimmsら, Biochemistry 20:883, (1981)の方法によって調製した。これらの引例は両方とも本願において参考として記載されている。卵黄ホスファチジルコリン (Sigma, St. Louis, MO) および³H-ホスファチジルコリン (Newengland Nuclear, Boston, MA) を100 μ g/mlで受容体画分中に溶解させ、次いでこの溶液を500mMのNaCl, 1mMのCa₂Clおよび1mMのMg₂Clを含有する50mMのトリスHClに対して4°Cで24時間透析した。生成したリポソームを超遠心分離においてショ糖勾配の表面に浮揚させることによって単離し、様々な基質を結合するためにテストした。

【0045】ポリスチレンマイクロタイタープレートウェル (Linbro/Titertek, Inglewood, CA) を、Engvallら, J. Cell. Biol. 103:2457 (1986) (本願で参考として記載されている) の方法に従って、ラミニン、フィブロネクチン、コラーゲンおよびヒトロネクチン (Telios Pharmaceuticals, Inc., La Jolla, CA) を含む細胞外マトリックスタンパクで、(PBS中20 μ g/ml使用) 4°Cで一晩コートすることによって調製した。バックグラウンドの非特異的結合を決定するために、ウシ血清アルブミン (BSA; 5mg/ml) によるコーティングを使用した (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。ラミニン受容体-リポソームの調製物は、ラミニンでコートされたマイクロタイターウェルへの強力な供与量依存性の結合を示し、フィブロネクチンにわずかに結合し、そして図5に示すように、コラーゲンタイプIまたはIVあるいはヒトロネクチンへのバックグラウンドを越えた結合を示さなかった。

【0046】同様のRuGli細胞抽出物から単離されたフィブロネクチン受容体を、リポソーム分析において比較のために使用した。この受容体で調製されたリポソームは、ラミニン受容体リポソームよりも大きな割合でフィブロネクチンに結合し、ラミニンへの結合は示さなかった。更に、特性制御には、キモトリプシンにより切断された細胞付着促進ヒトラミニン断片をリポソーム分析へ加えることによる、ラミニン受容体結合の阻害が含まれた。これらの断片は、ラミニン受容体リポソームのラミニンへの結合を阻害したが、GRGDSPPепチドまたはYIGSRラミニンペプチドは阻害しなかった。これらの分析の代表的な結果を図5に示す。

【0047】実施例3

治療剤を標的化するための受容体-リポソーム調製物の使用

受容体リポソームを上記のように調製し、所望の治療剤を文献に記載された方法 (GregoriadisおよびSenior, B

iochem. Soc. Trans. 12:337, (1984); 本願に参考として記載されている) に従って、この調製物に取り入れる。これらの複合リポソームに体重kg当り1-300 μ molの脂質を使用して静脈投与または局部投与する。このようなラミニン受容体リポソームを、例えば大量のラミニンを含有する薬剤を組織に標的化するために使用する。

【0048】実施例4

放射受容体分析による受容体特異性の分析

ラミニン受容体のラミニンへの結合およびこの結合に対する抗体およびタンパク断片の影響を、フィブロネクチン受容体について上記に説明した放射受容体分析 (Hautanenら, J. Biol. Chem. 264:1437-1442 (1989)) により調べた。マイクロタイターウェルを、1-2 μ g/mlのヒトラミニン、ウシタイプIコラーゲン (Collaborative research, Lexington, MA)、マウスタイプIVコラーゲン (BRL, Bethesda, MD)、ヒトプラズマフィブロネクチンまたはウシ血清アルブミンでコートした。表面ヨウ素化細胞から単離された¹²⁵I 標識受容体を、50mMのオクチル β -グルコピラノシド、1mMのPMSFおよび1mMのMnCl₂を含有するトリス緩衝化生理食塩水 (150mMのNaCl, 50mMのトリスHCl, pH7.5, TBS) の存在下において室温で2時間コートされたウェルに結合させた。ウェル当りに加えられた受容体の量は、10⁴cpmに相当した。インキュベーションに次いで、ウェルを洗浄し、結合受容体を、TBS中の1%のドデシル硫酸ナトリウムで可溶化し、結合放射能を計数することによって定量した。非特異性結合を、アルブミンでコートされたウェルにおいて測定した。結合の合計は、加えた放射能の5から10%の間であり、この内の70-80%は上記の基準から特異的であった。テストした各細胞タイプからのラミニン受容体は、図6に示される分析においてラミニンに結合した。受容体はまた、ある程度の変動はあるが、フィブロネクチンおよびタイプIVコラーゲンに結合した。この変動の理由は不明である。下記の説明に限定されないが、この相違は受容体の β サブユニットに存在し、タイプIVコラーゲンに対して親和性をもつ受容体が組成 $\alpha_3\beta_1$ を有し、(RuoslahtiおよびPierschbacher, 前出)、そして、タイプIVコラーゲンに対して親和性をもたない受容体が異なる β サブユニットを有すると思われる。この見解は、図4において立証されるRuGli細胞ラミニンおよびフィブロネクチン受容体の間の免疫上の相違によって支持される。

【0049】実施例5

ラミニン受容体結合部位の局在化

a. 電子顕微鏡検査

ラミニン受容体-ラミニン複合体の電子顕微鏡による分析を、受容体-フィブロネクチン複合体 (GallitおよびRuoslahti, J. Biol. Chem.

263:12927 (1988); 本願で参考として記載されている) について説明したように、かついく

15

つかの改変を加えて行った。アフィニティークロマトグラフィー溶離物からの受容体調製物を、各1 mMの Ca^{2+} 、 Mg^{2+} および Mn^{2+} の存在下で、マウスラミニン (BRL, Bethesda, Md) またはヒトラミニンのペプシン消化断片 (Dillnerら、Exp. Cell. Res. 177:186 (1988); 本願で参考として記載されている) と混合した。様々な割合の受容体およびラミニンを使用し、高温において二価カチオンの存在下で発生することが知られるラミニンの凝集を避けるために、受容体-ラミニン複合体のすべてのインキュベーションを4°Cで行った。

【0050】ラミニン受容体をマウスラミニンと混合する場合には、ラミニン分子のうちいくらかは受容体と複合化したようであった。受容体は、これらの複合体においてラミニンのロングアームの球形端と結合した。ラミニン受容体複合体に類似する構造物は、ラミニンを単独からなるあるいはMG-63またはRuGli細胞フィブロネクチン受容体と混合したラミニンからなるコントロール調製物において観察されなかった。単独に調製されたいくつかのサンプルからの多数のフィールドを調べると、100を越える数の可能な受容体-ラミニン複合体の内、約80%がロングアームの末端における球形領域と関連する受容体を有していた。可能な複合体の残りの内、受容体分子はショートアームの1つまたはクロスを中心と多様に関連しているようであった。マウスラミニンとともに得られた複合体に類似するラミニン-受容体複合体はヒトラミニンのペプシン消化断片をラミニン受容体と混合する際に見られた。

【0051】b. モノクローナル抗体による局在化

ラミニン分子のロングアームの末端における球形領域への受容体の好ましい結合は、ラミニンの神経突起促進活性を阻害することが可能な1群のモノクローナル抗体について以前に示されたものと同様であった。ペプシン抽出ヒトラミニンに対するモノクローナル抗体を、Engvallら、J. Cell Biol. 103:2457-2465 (1986) (本願で参考として記載された方法) によって調製した。これらの抗体の内2つ、3E5および4E10の放射受容体分析における受容体のラミニンへの結合を干渉する能力を調べた。3E5および4E10抗体は、濃度に依存するような方式でRuGli受容体のラミニンへの結合を阻害した。神経突起生成に影響を与えず、ラミニンクロスを中心付近の領域に結合する抗体2E8は、比較しうる抗体濃度においてほとんど阻害を示さなかった。関連しない特性を有するモノクローナル抗体もまた影響力がなかった。MG-63細胞受容体の結合を、この分析において3E5および4E10抗体によって阻害すると、ラミニン受容体は両方とも同一の部位に結合し得ることが示された。

【0052】c. cDNAクローニングによるモノクローナル抗体結合部位の局在化

受容体結合部位を規定するモノクローナル抗体の結合のためのこれらのクローンによって形成されたタンパクを

16

テストするために、ラミニンcDNAクローンを単離した。ラミニンに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を有する、胎盤細胞および内皮細胞の λ gt11cDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、多数の反応性を有するクローンが産生された。DNA配列、およびすでに文献に記載されたラミニンの配列 (Pikkarainenら、J. Biol. Chem. 262:10454-10462 (1987) およびPikkarainenら、J. Biol. Chem. 263:6751-6758 (1988)) との比較によって、これらのクローンのうちのいくつかは、B1およびB2鎖のC00H末端部位をコードすることが示された。A鎖クローンは同定されなかった。

【0053】B1およびB2鎖クローンから発現された融合タンパクを、マクロブランクフィルター分析 (Suzukiら、EMBO J. 4:2519-2524 (1985)) において、モノクローナル抗体との反応性についてテストした。B1鎖のC00H末端をコードするすべてのクローン由来の融合タンパクは3E5抗体と反応したが、この抗体はB2鎖融合タンパクとは反応しなかった。3E5抗体と反応性を有する最短のクローンはB1鎖のC00H末端の252個のアミノ酸をコードする。B1およびB2鎖のC00H末端からの融合タンパクは、他の抗体4E10とは反応性を持たなかった。

【0054】実施例6

ラミニン受容体に対する抗体の調製および受容体を検出するためのそれらの使用

a. ポリクローナル抗体

ウサギを、フロイントの完全アジュバント中の精製ラミニン受容体で免疫した。フロイントの不完全アジュバント中に50 μ gの受容体を含有するブースタを3週間間隔で注射し、最終の注射の1週間後に、血清を採取する。抗血清を、セファロースとそれぞれ結合しているヒトブラズマタンパク、フィブロネクチンおよびラミニンに吸収させた。更に、ウシ血清アルブミンが結合したセファロースカラムで、ラミニン受容体の源として作用する同様の細胞または組織抽出物を分画することによって得られる「疑似精製受容体」を吸収させた。受容体単離におけると同様の工程を次に行い、受容体単離において受容体を含む画分を疑似精製受容体として採取した。次いで、更に、これもまたセファロースと結合したフィブロネクチン受容体に抗血清を吸収させた。フィブロネクチン受容体をPytelaら、前出、の方法で単離した。2mlの血清を連続して100 μ gの疑似精製受容体タンパクまたは100 μ gのフィブロネクチン受容体を含有する1mlのセファロースカラムを通過させることによって、疑似精製受容体-セファロースおよびフィブロネクチン受容体-セファロースによる吸収を行った。非結合物質の反応性を、固相酵素免疫測定法およびSDS-PAGE免疫ブロッティングにより行った。固相酵素免疫測定法 (ELISA; Engvall, Meth. Enzymol. 70:419-439, 1980; 本願で参考として記載している) は、抗体として精製ラミニン受容体およびフィブロネクチン受容体を用いて行い、そして、

SDS-PAGE免疫ブロッティングは、受容体に対して、および受容体の源として働く細胞または組織からの全細胞抽出物または全組織抽出物に対して行った。この吸収を、これらの分析により、抗血清が特異的であることが示されるまで繰り返した。抗血清は、それがELISA中のラミニン受容体とのみ反応し、Towbinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350 (1979)およびArgravesら、前出、

(図4参照)の方法(本願で参考として記載されている)に従って行われた免疫ブロッティングにおいて、ラミニン受容体サブユニットとのみ結合し、フィブロネクチン受容体サブユニットとは反応しない場合に、ラミニン受容体に対して特異的であると見なされた。同様の手法を使用し、疑似精製受容体タンパクおよびラミニン受容体により吸収することによって、フィブロネクチン受容体抗血清からフィブロネクチン受容体特異性抗体を得た。受容体-セファロースカラムを、50mMトリスHCl, pH7.0中の8Mの尿素で洗浄することによって再生した。

【0055】b. モノクローナル抗体

マウスに、フロイントの完全アジュバント中の10 μ gの精製ラミニン受容体を皮下注射し、次いで同量の精製ラミニン受容体をアジュバントを使用せずに腹腔内注射(ブースタ)することにより免疫した。ブースタ注射の3日後、免疫したマウスからの脾臓細胞を採取し、文献において説明されるようにハイブリドーマを生成するために使用した。ラミニン受容体と反応するハイブリドーマ分泌抗体を、抗体としてラミニン受容体を使用して固相酵素免疫分析によって選択した(Engvall, ら, Meth. Enzymol. 70:419-439, 1980)。分析のために、オクチルグルコシド含有ストック溶液をリン酸塩緩衝化生理食塩水で少なくとも1:10に希釈した1 μ g/mlの受容体溶液で、マイクロタイターウェルをコートした。ラミニン受容体と特異的に反応するこれらの抗体を、フィブロネクチン受容体に対して陽性な抗体をテストすることによって更に選択した。この反応性は、ラミニン受容体以外の受容体を含有する細胞抽出物に対してSDS-PAGE免疫ブロッティングを行うことによって、SDS変性の受容体と反応し得る抗体について証明された。

【0056】受容体のラミニン結合機能を阻害する抗体を、細胞付着分析において更に選択した。モノクローナル抗体を、プロテイン-Aセファロースによるアフィニティークロトグラフィー(Pharmacia, Uppsala, Sweden)によってハイブリドーマ培地から単離し(当該技術分野に熟知のその他の方法も使用し得る)、単離した抗体の、免疫受容体の源として作用する細胞のラミニンへの付着を阻害する能力をテストした。マイクロタイターウェルを1 μ g/mlの細胞付着促進ヒトラミニン断片でコートし、RuGli細胞を、様々な濃度のモノクローナル抗体のウェルにそれぞれ加えた。ポリクローナル抗ラミニン受容体抗体を陽性コントロールとして使用し、抗フィブロネクチン受容体 α サブユニットモノクローナル抗体

を陰性コントロールとして使用した。抗体が所望の阻害活性を有している場合には、ほとんどの細胞が分析の末期においてウェルに付着しなかった。

【0057】実施例7

腫瘍侵入分析における抗ラミニン受容体抗体のテスト

腫瘍細胞が組織に侵入するのを抗ラミニン α サブユニット抗体が干渉する能力をテストするために、羊水膜侵入分析を使用する。RuGliグリア芽細胞腫細胞を、様々な濃度の抗ラミニン受容体抗体および上記と同様のコントロール抗体の存在下で、文献(Gehlsenら, J. Cell Biol. 106:925-930, 1988; 本願に参考として記載している)において記述されているように、羊水膜を通して移動させる。阻害抗体の存在下において羊水膜を通して移動する細胞は、コントロール抗体の場合よりも少ない。

【0058】実施例8

放射受容体結合分析におけるラミニン受容体の阻害

マイクロタイターウェルを、実施例4において記述したようにPBS中の1から2 μ Lでラミニンによりコートした。次いで、実施例1において記述したように、A-431またはRuGli細胞から単離したラミニン受容体を単独で(LM)、またはラミニンのキモトリプシン消化断片(chymo. frag., 25 μ g/mL Dillnerら、前出)、110kDのフィブロネクチンの断片(Pierschbacherら, Cell 26:259-267 (1981)における110kD frag., 25 μ g/mL, 120kDの断片)、または標識されないラミニン受容体(Cold LM R)の存在下においてマイクロタイターウェルに加えた。

【0059】その結果を図7に示す。データは、ラミニン結合が阻害されていないときを100パーセントとして比較した場合の結合したラミニン受容体の割合(百分率)を示す。観察されるように、分子のC00H末端部を構成する部分由来のラミニンの細胞付着促進断片は、ラミニン受容体がラミニンでコートされたウェルへ結合するのを阻害した。更に、分子の細胞付着領域由来のフィブロネクチン断片もまた、阻害的であった。予想されたように、コントロールとしてテストされた標識されないラミニン受容体はまた、放射性受容体の結合を阻害した。

【0060】

【発明の効果】本発明によれば、細胞および組織でのラミニン受容体の分析における直接的で迅速な利用が達成される。上記の単離方法は、培養細胞または組織サンプルをラミニン受容体の含量について分析するのに使用され得る。このような分析は、腫瘍等の細胞の付着能力を決定するのに重要である。あるいは、単離された受容体は、受容体の定量的ための抗体を調製するために使用され得る。このような抗体と共に、受容体は、放射性免疫分析またはELISAのような受容体についての分析を確立させるであろう。受容体へ結合する化合物は、受容体のラミニンへの結合と競合するように、受容体と共に選択され得、例えば腫瘍侵入中の腫瘍細胞の基底部膜への付着

19

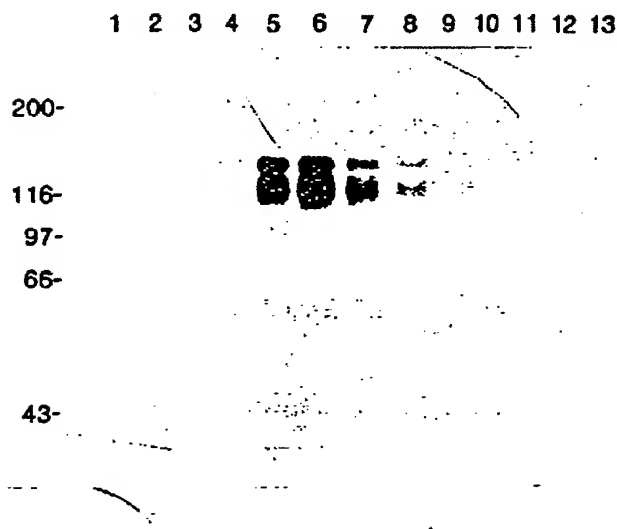
を防ぐ場合に有用である。あるいは、不溶形態である場合に、この様な基質は、組織再構築におけるラミニンの細胞付着促進効果を再生するために使用され得る。上記実施例において記述されるラミニン受容体で主としてなる試薬は、基質を選択された組織に運搬するのに使用され得る。

【図面の簡単な説明】

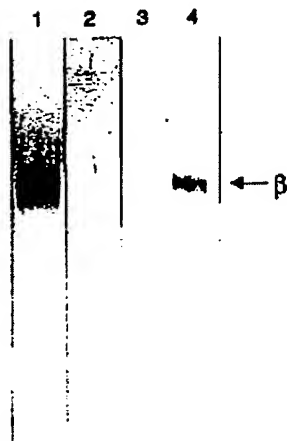
【図1】 ラミニン親和性マトリックスから溶離された面分のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 写真である。

【図2】 非還元 (NR) および還元 (R) 条件の下での RuGII ラミニン受容体 (レーン1) およびフィブロネクチン受容体 (レーン2) のドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 写真である。

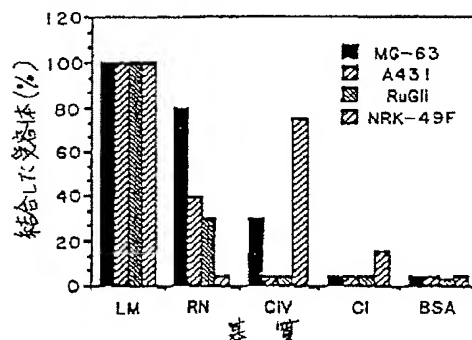
【図1】



【図4】



【図6】



20

【図3】 ラミニン受容体の免疫プロット分析を示す、RuGII細胞から単離されたフィブロネクチン (A) およびラミニン (B) 受容体を非還元条件の下で電気泳動した写真である。

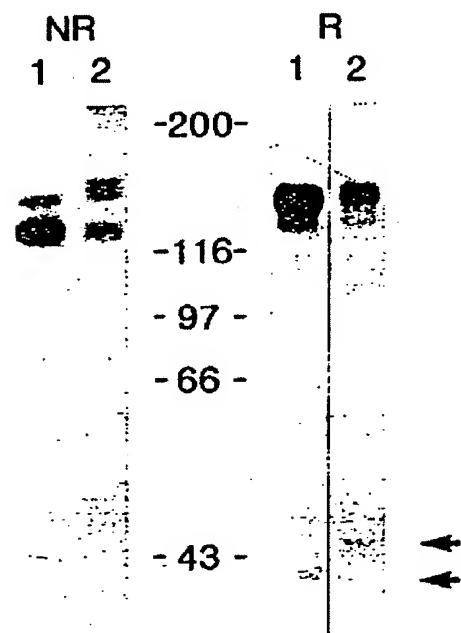
【図4】 ラミニンおよびフィブロネクチン受容体の免疫プロット分析を示す、RuGII細胞抽出物から単離したフィブロネクチン (レーン1、3) およびラミニン (レーン2、4) 受容体を非還元条件の下で電気泳動した写真である。

10 【図5】 ラミニン受容体を含むリポソームの基質表面への結合を示すグラフである。

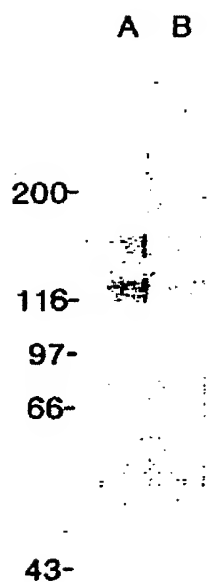
【図6】 放射受容体結合分析を表すグラフである。

【図7】 放射受容体結合分析におけるラミニン受容体結合阻害率を表すグラフである。

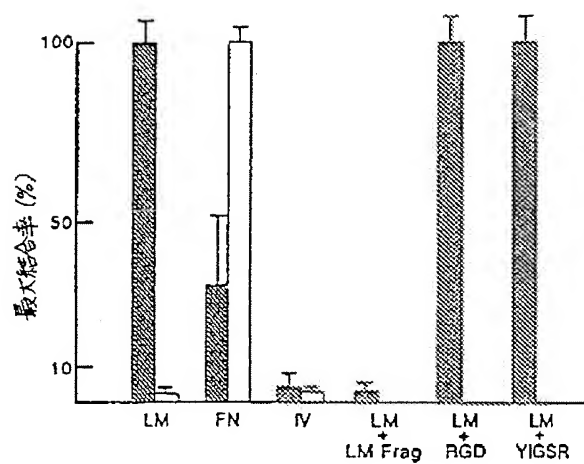
【図2】



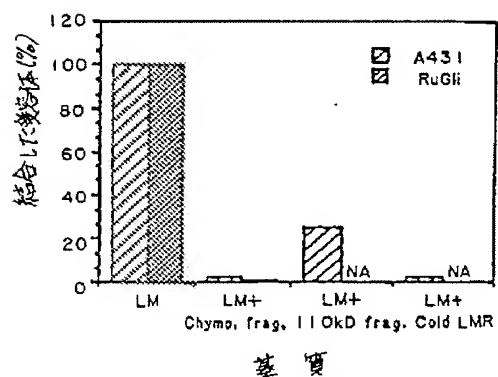
【図3】



【図5】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

G 0 1 N 33/566

33/577

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

B

(72)発明者 エヴァ エングヴァル
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067
ランチョ サンタ フェ, ピー. オー.
ボックス 1054

(72)発明者 カート アール ゲールセン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122
サンディエゴ, パルミラ ドライブ
7646-16